

EP672184

Publication Title:

EP0672184

Abstract:

Abstract not available for EP0672184

Abstract of corresponding document: FR2693209

A method for determining the nucleotide size of DNA fragments separated by gel electrophoresis, comprising the steps of (i) measuring the migration time of each detected DNA fragment, and (ii) correlating the size of each detected DNA fragment with its migration time. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

This Patent PDF Generated by Patent Fetcher(TM), a service of Stroke of Color, Inc.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - <http://www.sughrue.com>

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12Q 1/68	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/01581 (43) Date de publication internationale: 20 janvier 1994 (20.01.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00675 (22) Date de dépôt international: 2 juillet 1993 (02.07.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/08253 3 juillet 1992 (03.07.92) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR). INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75015 Paris (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement) : PANNETIER, Christophe [FR/FR]; 12, boulevard Vincent-Auriol, F-75013 Paris (FR).		(74) Mandataire: MARTIN, Jean-Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR). (81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: METHOD FOR DETERMINING THE NUCLEOTIDE SIZE OF DNA FRAGMENTS (54) Titre: PROCEDE DE DETERMINATION DE LA TAILLE EN NUCLEOTIDES DE FRAGMENTS D'ADN (57) Abstract A method for determining the nucleotide size of DNA fragments separated by gel electrophoresis, comprising the steps of (i) measuring the migration time of each detected DNA fragment, and (ii) correlating the size of each detected DNA fragment with its migration time. (57) Abrégé La présente invention concerne un procédé de détermination de la taille en nucléotides de fragments d'ADN séparés par électrophorèse sur gels caractérisé par le fait qu'il comprend les étapes qui consistent à: i) mesurer le temps de migration de chaque fragment d'ADN détecté, et ii) établir une corrélation entre la taille de chaque fragment d'ADN détecté et le temps de migration de celui-ci.		

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - <http://www.sughrue.com>

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NE	Niger
BE	Belgique	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NO	Norvège
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IE	Irlande	PL	Pologne
BR	Brésil	IT	Italie	PT	Portugal
BY	Bélarus	JP	Japon	RO	Roumanie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	République slovaque
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
CN	Chine	LV	Lettonie	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TC	Togo
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DE	Allemagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

**PROCEDE DE DETERMINATION DE LA TAILLE EN
NUCLEOTIDES DE FRAGMENTS D'ADN.**

La présente invention concerne un procédé permettant de déterminer la taille en nucléotides de
5 fragments d'ADN.

Le procédé conforme à la présente invention exploite un processus de séparation des fragments d'ADN, par électrophorèse sur gel.

La séparation et la détection de fragments d'ADN
10 marqués, par exemple marqués par des marqueurs fluorescents, par électrophorèse sur gel, sont bien connues de l'homme de l'art.

On connaît sur le marché différents appareillages aptes à réaliser ces fonctions. Parmi ces appareillages
15 connus on peut citer le dispositif automatisé d'électrophorèse sur gel à séquençage d'ADN automatique commercialisé par la Société Applied Biosystem sous la référence 373A. Ce dispositif est décrit dans le document US-A-4 811 218.

20 Les appareillages connus de séparation de fragments d'ADN par électrophorèse sur gel comprennent généralement :

- un support plan de migration formé d'un gel, par exemple en polyacrylamide ou agarose, apte à recevoir des
25 échantillons d'ADN préalablement marqués,
- une source d'alimentation électrique continue haute tension, typiquement de 1000 à 1500V, connectée entre les extrémités du gel support pour induire la séparation des fragments d'ADN, par électrophorèse,
- 30 - un ensemble de détection des fragments d'ADN migrant successivement sur le gel support, placé à la base de celui-ci et
- un ensemble d'enregistrement et de traitement des données issues de l'ensemble de détection.

35 Les échantillons d'ADN sont préparés selon

diverses techniques bien connues de l'homme de l'art.

Ces techniques de préparation connues utilisent généralement une méthode d'amplification enzymatique in vitro de séquences d'acides nucléiques ADN mono-brins ou double brins, notamment par PCR (Polymerase Chain Reaction) ou par la technique par SDA (Strand Displacement Amplification).

Les techniques d'amplification in vitro, notamment par PCR ou SDA, ont été décrites dans la littérature. On peut citer en particulier les publications EP-A-201 184 et EP-A-200 362 sur la technique de base pour la méthode PCR. La technique d'amplification dite par SDA (Strand Displacement Amplification) a été décrite lors de la conférence de San Diego sur les Acides Nucléiques les 20-22 novembre 1991.

Dans ces méthodes d'amplification enzymatique d'ADN, l'amplification de la séquence s'effectue par cycles successifs.

Chaque cycle comporte plusieurs étapes :

- une étape d'hybridation d'amorces oligonucléotides spécifiques sur les extrémités 5' des fragments d'ADN qui leur sont complémentaires, et
- une étape d'élongation à partir des extrémités 3' des amorces à l'aide d'une ADN polymérase.

Le facteur de multiplication des fragments d'ADN est en théorie de deux à chaque cycle.

Dans les techniques d'amplification enzymatique d'ADN du type PCR, les échantillons sont dénaturés par la chaleur au début de chaque cycle. L'emploi d'une polymérase thermostable, la Taq polymérase, a permis de développer des cycleurs automatiques (dénaturation thermique / hybridation / polymérisation enzymatique) dont les différentes étapes ne se distinguent que par leur température opératoire. Les conditions de dénaturation correspondent généralement à une élévation de la

température du milieu réactionnel au-dessus de 90°C, l'hybridation a lieu généralement entre 50 et 70°C et l'élongation par l'ADN polymérase peut s'effectuer à des températures relativement élevées, de l'ordre de 70°C si
5 l'on utilise une ADN polymérase stable à la chaleur.

En revanche, dans d'autres techniques d'amplification enzymatique d'ADN, telles que la technique par SDA, les produits obtenus à la fin de chaque cycle ne sont pas dénaturés par la chaleur. Il s'agit de méthodes
10 isothermes.

La méthode d'amplification par SDA repose sur l'utilisation d'amorces oligonucléotidiques modifiées en 5' par l'addition d'une séquence d'ADN reconnue par une enzyme de restriction, par exemple l'enzyme Hinc II. Le
15 processus requiert la formation d'un site de restriction thiolé par incorporation de déoxyadénosine triphosphate soufré, et les actions alternées de ladite enzyme Hinc II qui hydrolyse partiellement (sur un seul brin), ledit site de restriction, et de l'ADN polymérase qui synthétise à
20 partir du point d'hydrolyse un nouveau brin, avec déplacement simultané de la séquence nucléique précédemment coupée, sans que la dénaturation soit nécessaire. L'hybridation des amorces modifiées sur la cible nécessite seulement une première étape de
25 dénaturation de l'ADN. La réaction se fait ensuite à 37°C.

Le marquage des fragments est opéré généralement à l'aide de quelques cycles d'amplification additionnels en présence d'oligonucléotides amorces présentant un marquage radioactif, enzymatique ou, de préférence, fluorescent, à
30 base de fluorophores.

Le gel support de migration comprend généralement plusieurs pistes parallèles, par exemple 24 pistes.

Dans le cas préférentiel d'un marquage fluorescent à base de fluorophores, l'ensemble de détection comprend
35 un système d'excitation (laser ou lampe halogène par

exemple) et un capteur sensible au rayonnement fluorescent
généralisé par l'échantillon excité. Dans certains
dispositifs, un jeu de miroirs placés sur un chariot
déplacé en translation en va et vient en regard de la base
5 du gel, balaye successivement les diverses pistes,
réfléchit le rayonnement d'excitation sur l'échantillon et
renvoie le rayonnement fluorescent sur le capteur.

Dans d'autres dispositifs, le rayonnement
d'excitation est directement envoyé dans l'épaisseur du
10 gel, perpendiculairement à la direction d'électrophorèse
et parallèlement au plan du gel, tandis qu'une série de
capteurs recueille le signal de fluorescence.

Le capteur délivre un signal dont l'amplitude est
proportionnelle à la concentration de la couleur
15 fluorescente détectée, pourvu que cette amplitude reste
inférieure à un certain seuil.

Par ailleurs, pour certains dispositifs, on sait
utiliser simultanément quatre fluorophores de "couleurs"
différentes, ce qui permet de placer quatre échantillons
20 de marquages différents sur chaque piste.

Pour cela, il est simplement nécessaire de prévoir
un ensemble de filtres motorisé par exemple une roue à
quatre filtres déplacée séquentiellement, en amont du
capteur, pour déceler successivement chacun des
25 rayonnements et détecter par conséquent chacun des
échantillons.

La présente invention peut par exemple trouver
application dans le procédé de description des répertoires
du système immunitaire, présenté dans la demande de brevet
30 déposée en France le 9.01.1991 sous le N°91 00189.

Ce procédé se caractérise essentiellement en ce
que

- à partir d'un prélèvement biologique, on effectue la
transcription réverse des ARNm qu'il contient,
- 35 - on effectue ensuite, sur le produit de transcription (ou

directement sur l'ADN extrait de l'échantillon), des amplifications séparées pour chaque couple d'amorce V, C, V correspondant à un segment variable du répertoire en cause et C s'hybridant au segment constant du répertoire étudié,

- sur chacun de ces produits d'amplification on effectue, pour chaque segment J du répertoire, marqué, une étape d'élongation utilisant comme amorce une oligonucléotide spécifique de ce segment J et le produit d'amplification comme matrice,
- pour chaque produit d'élongation correspondant à un triplet V,C,J ainsi obtenu on fait apparaître la taille et la quantité des différents produits d'élongation,
- la description du répertoire est réalisée pour chaque élément du répertoire correspondant à un triplet V,C,J et à la taille de l'élément par la mesure de la quantité de cet élément dans ledit répertoire.

On se reportera utilement à la description de cette demande de brevet FR 91 00189 pour la bonne compréhension de ce processus de description des répertoires du système immunitaire.

La présente invention peut également trouver application dans le procédé de détermination de la quantité d'un fragment d'ADN d'intérêt par une méthode d'amplification quantitative, présenté dans la demande de brevet déposée en France le 15 Novembre 1991 sous le n° 91 14089.

Ce procédé se caractérise essentiellement en ce que :

- 1) on ajoute à l'échantillon à analyser contenant le fragment d'ADN d'intérêt, un fragment d'ADN standard différent du fragment d'ADN d'intérêt mais amplifiable par les mêmes oligonucléotides amorces, les fragments d'ADN standards et d'intérêt ne différant en séquences et/ou en taille de pas plus de 10% environ, de préférence de pas

- plus de 5 nucléotides par brin,
- 2) on co-amplifie les fragments d'ADN d'intérêt et standard avec les mêmes oligonucléotides amorces, de préférence jusqu'à saturation de l'amplification du mélange de ces fragments d'ADN,
- 3) on ajoute dans le milieu réactionnel obtenu à l'étape 2) un ou plusieurs oligonucléotide(s) amorce(s) marqué(s), spécifique(s) des fragments d'ADN d'intérêt et standards, et différents desdits oligonucléotides amorces de l'étape 2), et on effectue un ou quelques cycle(s) d'amplification supplémentaire(s) avec le ou lesdits oligonucléotide(s) amorce(s) marqué(s), de sorte que, au cours d'un cycle, après dénaturation de l'ADN, le ou lesdits oligonucléotide(s) amorce(s) marqué(s) s'hybride(nt) avec lesdits fragments en un site approprié pour qu'une élongation par l'ADN polyméase génère des fragments d'ADN marqués de taille et/ou de séquences différentes ou avec des marqueurs différents selon qu'ils proviennent des fragments d'ADN d'intérêt ou standards respectivement,
- 4) on détermine la quantité initiale de fragment d'ADN d'intérêt comme étant le produit de la quantité initiale de fragment d'ADN standard et du rapport entre la quantité de fragment d'ADN d'intérêt amplifié et la quantité de fragment d'ADN standard amplifié, rapport qui est identique à celui des quantités des fragments d'ADN marqués provenant respectivement des fragments d'ADN d'intérêt et standards amplifiés obtenus à l'étape 3).

Selon une mise en oeuvre particulière, la détermination de la dernière étape du procédé précité se fait en :

- séparant selon leur taille par électrophorèse sur gel les fragments d'ADN marqués provenant des fragments d'ADN d'intérêt et standards amplifiés, puis en
- détectant les intensités des signaux correspondant au

marqueur d'une amorce respective pour les fragments d'ADN marqués provenant des fragments d'ADN d'intérêt et standards respectivement.

On se reportera utilement à la description de cette demande de brevet FR 91 14089 pour la bonne compréhension de ce processus de détermination de la quantité d'un fragment d'ADN d'intérêt.

Dans les appareillages connus, la taille en nucléotides des fragments d'ADN est évaluée de façon assez rudimentaire à l'aide d'une comparaison visuelle de la position des échantillons détectés par rapport à la position de standards de taille marqués qui sont codéposés sur le gel support et soumis à la même électrophorèse que les échantillons à mesurer.

La présente invention a pour but de perfectionner la technique existante en proposant de nouveaux moyens permettant une mesure plus précise de la taille des fragments d'ADN.

Ce but est atteint selon la présente invention grâce à un procédé comprenant les étapes qui consistent à :

- i) mesurer le temps de migration, sur une longueur constante prédéterminée, de chaque fragment d'ADN détecté, et
- ii) établir une corrélation entre la taille de chaque fragment d'ADN détecté et le temps de migration de celui-ci.

Selon une caractéristique avantageuse de la présente invention, la corrélation entre la taille de chaque fragment d'ADN détecté et le temps de migration de celui-ci, est établi sur la base de la loi :

$$L(t) = A \exp[-B/(t+t_0)] + C$$

dans laquelle A, B et C sont des constantes, t représente le temps de migration, t_0 représente une constante de temps et $L(t)$ représente la longueur en nucléotides de

l'ADN détecté.

D'autres caractéristiques, buts et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture de la description détaillée qui va suivre, et en regard des
5 dessins annexés donnés à titre d'exemple non limitatif et sur lesquels :

- la figure 1 représente un organigramme schématique général du procédé conforme à la présente invention,
- les figures 2 à 7 représentent sous forme
10 d'organigrammes des étapes particulières de ce procédé, et
- la figure 8 représente un organigramme général regroupant l'ensemble des étapes qui vont être décrites par la suite.

Comme indiqué précédemment, le procédé conforme à
15 la présente invention, conçu pour déterminer la taille en nucléotides de fragments d'ADN, exploite un processus de séparation des fragments d'ADN par électrophorèse sur gel.

Ce processus de séparation connu en lui-même et rappelé ci-dessus dans ses caractéristiques essentielles
20 ne sera pas décrit plus en détail par la suite..

Plus précisément, la présente invention exploite un processus selon lequel des standards de taille connue sont codéposés sur le gel support. De préférence, il est ainsi déposé des standards de taille connue sur trois
25 pistes témoins, à savoir sur les deux bords latéraux du gel support et au centre de celui-ci.

Le nombre n de standards de taille ainsi codéposés sur chaque piste témoin du gel support peut être choisi quelconque par l'utilisateur. Toutefois, de préférence, on
30 dépose cinq standards de taille sur chaque piste témoin.

A titre d'exemple non limitatif, ces cinq standards de taille connue peuvent comprendre respectivement 96, 114, 140, 157 et 176 nucléotides.

Comme cela est schématisé sur la figure 1 annexée,
35 le procédé conforme à la présente invention comprend de

préférence les étapes consistant à :

- a) opérer une électrophorèse sur gel d'échantillons d'ADN marqués et de standards de taille marqués codéposés sur le gel (étape 100 sur la figure 1),
- 5 b) détecter et mémoriser le signal issu du capteur de l'ensemble de détection (étape 200 sur la figure 1),
- c) filtrer les données mesurées (étape 300 sur la figure 1),
- d) déterminer la taille des fragments d'ADN détectés
- 10 (étape 400 sur la figure 1), et
- e) visualiser les résultats obtenus (étape 500 sur la figure 1).

Le cas échéant, l'étape de filtrage 300 peut être opérée avant l'étape de mémorisation 200.

- 15 De préférence, à l'étape 200, les courbes issues du capteur sont stockées dans un fichier spécifique respectif à raison d'un fichier par piste de mesure.

- 20 La phase de filtrage 300 comprend de préférence, comme cela est schématisé sur la figure 2, l'étape initiale 210 de filtrage passe-bas modulé par une convolution de Lanczos, afin d'éliminer le bruit haute fréquence, à l'aide d'un filtre présentant de préférence une fréquence de coupure réglable et une largeur de fenêtre réglable.

- 25 La largeur de la fenêtre de Lanczos est également réglable.

- 30 Enfin, la phase de filtrage 300 comprend l'étape ultime 320 de soustraction de la ligne de base obtenue en tout point, comme la valeur minimale de la courbe filtrée, sur une valeur de fenêtre déterminée.

La largeur de cette fenêtre doit bien sûr être bien supérieure à la largeur d'un pic ; de préférence, la largeur de cette fenêtre est réglable.

- 35 On va maintenant décrire l'étape 400 de détermination de la taille des fragments d'ADN détectés.

Comme cela a été évoqué précédemment, selon l'invention, l'étape principale de détermination de la taille des fragments d'ADN consiste, après avoir mesuré le temps de migration de chaque fragment d'ADN détecté, à
5 établir une corrélation entre la taille L de chaque fragment d'ADN détecté et le temps de migration de celui-ci à l'aide de la relation :

$$L(t) = A \exp[-B/(t+t_0)] + C$$

dans laquelle A, B et C sont des constantes, t représente
10 le temps de migration et t_0 représente une constante de temps.

On notera que $t_0=0$ lorsque l'origine temporelle de la mesure coïncide avec le début de l'électrophorèse.

Plus précisément, comme cela est schématisé sur la
15 figure 3, l'étape 400 consiste à :

- a) déterminer les coefficients A, B, C pour chaque piste témoin comportant des standards de taille (étape 410 sur la figure 3), dont les temps de migration t_i ont été mesurés,
- 20 b) opérer une interpolation des temps de migration t_i mesurés dans les pistes témoin, pour les pistes de mesure (étape 420 sur la figure 3),
- c) à partir de cette interpolation, déterminer, pour chaque piste de mesure la valeur des paramètres A, B et C
25 (étape 430 sur la figure 3)
- d) déterminer la taille des fragments d'ADN sur la base de la loi précitée (étape 440 sur la figure 3) établie pour chacune des pistes du gel.

L'étape 410 est illustrée sous forme
30 d'organigramme sur la figure 4.

Cette étape 410 débute par une étape 411 de saisie des i standards de taille dans le fichier correspondant. Cette étape 411 détaillée sur la figure 5 est opérée comme suit.

35 Dans une première phase 4110, l'appareillage

recherche automatiquement dans une fenêtre de mesure fixée par défaut, mais modifiable par l'utilisateur, les i pics de rayonnement. Cette recherche est opérée en comparant (étape 4111) les pics d'intensité mesurés avec un seuil
5 progressivement abaissé (étape 4112) jusqu'à obtention des i pics (étape 4113).

Si la première phase 4110 ci-dessus ne permet pas d'obtenir les i pics recherchés, l'appareillage passe à une seconde phase 4114 dans laquelle l'utilisateur peut
10 soit modifier la largeur de la fenêtre à l'étape 4115 et relancer la phase de recherche automatique précitée 4110, soit opérer une recherche manuelle (étape 4116) en identifiant par tous moyens connus (par exemple à l'aide d'un pointeur déplacé sur écran) les pics recherchés, sur
15 une représentation de la courbe mesurée visualisée sur écran.

Comme cela est représenté sur la figure 4 annexée, une fois les standards de taille identifiée de façon automatique ou manuelle à l'étape 411 de saisie des
20 standards, cette étape est suivie d'une étape 412 de mesure du temps t_i de migration des standards de longueur connue L_i puis d'une étape 413 de calcul des coefficients A , B et C pour ces standards sur la base de cette mesure.

Le temps de migration t_i des standards de taille, mesuré à l'étape 412, correspond au temps mis par ceux-ci
25 pour atteindre le capteur de l'ensemble de détection placé à la base d'un gel support, à partir d'une origine temporelle.

Cette origine temporelle peut correspondre à l'initialisation de l'électrophorèse, auquel cas la
30 constante de temps t_0 est nulle.

L'origine temporelle peut aussi être postérieure à l'initialisation de l'électrophorèse, auquel cas la constante de temps t_0 est égale au décalage entre
35 l'initialisation de l'électrophorèse et l'origine

temporelle considérée. L'utilisateur introduit alors la valeur de ce paramètre une fois pour toute. Dans la suite, on prend $t_0 = 0$ pour simplifier l'écriture.

L'étape 413 est illustrée sur la figure 6.

- 5 A l'étape 413, les coefficients A, B, C sont tout d'abord estimés (étape 4130) à l'aide de la fonction d'erreur suivante au moindres carrés :

$$f(A,B,C) = \sum_{i=1}^n [L_i - (A \exp(-B/t_i) + C)]^2$$

10

dans laquelle n est le nombre d'ADN standards, en recherchant la valeur de ces coefficients A, B et C pour lesquels les fonctions dérivées partielles en A, B, C, de cette fonction f(A, B, C) sont nulles.

- 15 On obtient ainsi un système de trois équations dont l'une en fonction seulement de B :

$$\begin{aligned} & \sum_{i=1}^n (L_i - L) \exp(-B/t_i) \times \\ & \frac{\sum_{i=1}^n (\exp(-B/t_i) - \exp(-B/t)) \exp(-B/t_i) 1/t_i}{\sum_{i=1}^n (L_i - L) \exp(-B/t_i) 1/t_i} = \end{aligned}$$

20

$$\begin{aligned} & \frac{\sum_{i=1}^n (\exp(-B/t_i) - \exp(-B/t)) \exp(-B/t_i)}{\sum_{i=1}^n (L_i - L) \exp(-B/t_i) 1/t_i} \times \\ & \frac{\sum_{i=1}^n (\exp(-B/t_i) - \exp(-B/t)) \exp(-B/t_i)}{\sum_{i=1}^n (L_i - L) \exp(-B/t_i) 1/t_i} = \end{aligned}$$

25

$$\begin{aligned} & A = \frac{\sum_{i=1}^n (L_i - L) \exp(-B/t_i)}{\sum_{i=1}^n (\exp(-B/t_i) - \exp(-B/t)) \exp(-B/t_i)} \\ & C = \frac{\sum_{i=1}^n (L_i - L) \exp(-B/t_i)}{\sum_{i=1}^n (\exp(-B/t_i) - \exp(-B/t)) \exp(-B/t_i)} \end{aligned}$$

30

$$C = (1/n) \sum_{i=1}^n [L_i - A \exp(-B/t_i)]$$

avec comme notation que :

5 $\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X(t_i)$ est la moyenne des $X(1), \dots, X(n)$.

La première équation ci-dessus permet donc de déterminer la valeur de la constante B.

10 Et une fois la constante B obtenue, on obtient les constantes A et C sur la base des deux dernières équations ci-dessus.

Une fois les coefficients A, B et C obtenus à l'étape 4130 pour les diverses pistes standards, les valeurs A, B, C sont réportées à l'étape 4131 dans la fonction $f(A,B,C)$ ou $L(t)=A \exp(-B/t)+C$ afin de vérifier pour chaque valeur de consigne connue L_i d'un standard que l'écart entre la taille théorique ainsi mesurée et la valeur de consigne connue L_i , est inférieur à un seuil donné égal à un nombre prédéterminé de bases (étape 4132).

Dans l'affirmative, le procédé conforme à la présente invention est poursuivi par l'étape d'interpolation 420.

25 Dans la négative, le calcul des coefficients A, B et C est repris, en vue d'une optimisation, après modification du seuil défini par un nombre prédéterminé de bases, par l'utilisateur à l'étape 4133.

30 L'étape d'interpolation 420 a pour but de définir les valeurs des temps de migration t_i des marqueurs non standards pour chaque piste de mesure d'échantillons sur la base des valeurs mesurées pour les pistes standards. Cette étape d'interpolation 420 a pour but de réduire les erreurs de mesure dues à une dispersion des paramètres de migration selon la largeur du gel support.

35 Il peut s'agir d'une interpolation linéaire.

Toutefois, dans le cadre de la présente invention, on peut procéder à une interpolation de type parabolique, par exemple l'interpolation de Simpson. L'interpolation de type parabolique donne en effet un résultat plus précis
5 que l'interpolation linéaire.

Enfin dans l'étape 420, on détermine pour chaque piste de mesure, les valeurs des coefficients A, B et C à partir des valeurs t_i résultant de l'interpolation, et ce à l'aide des relations données précédemment.

10 En pratique, certains appareillages nécessitent que tous les échantillons ne soient pas chargés sur le gel simultanément. Le plus souvent les gels supports possèdent ainsi des pistes paires ayant une origine temporelle commune et des pistes impaires ayant également une origine
15 temporelle commune, mais décalée dans le temps par rapport aux pistes paires.

Dans ce cas, des standards de taille sont codéposés sur le gel support respectivement avec les mêmes origines que les diverses pistes de mesure.

20 Il est donc nécessaire de calculer les coefficients A, B, C, pour les standards de taille présentant des origines différentes correspondant respectivement aux pistes paires et impaires et de procéder à des interpolations respectives pour les pistes
25 de mesure paires et impaires respectivement.

En d'autres termes, les étapes 410 et 412 sont réitérées pour chaque origine de piste de mesure.

Une fois les coefficients A, B et C connus, et de préférence mémorisés pour chaque piste de mesure, on
30 procède à l'étape 440.

Comme cela est illustré sur la figure 7, cette étape 440 se décompose en trois sous-étapes suivantes :

a) saisie des pics du signal de mesure correspondant aux fragments d'ADN (étape 441 sur la figure 7). Cette saisie
35 peut être opérée automatiquement en comparant l'amplitude

du signal de mesure avec un seuil. Ce seuil peut être réglable ainsi que la largeur de la fenêtre considérée. La saisie des pics utiles peut aussi être opérée manuellement. L'opérateur recherche alors manuellement les
5 pics du signal correspondant aux fragments d'ADN, comme décrit précédemment et illustré sur la figure 5 pour la saisie des standards.

b) mesure à l'étape 442 du temps de migration des fragments d'ADN, comme décrit précédemment à l'étape 412
10 pour les standards, et enfin

c) calcul à l'étape 443 de la taille des différents fragments d'ADN sur la base de la relation :

$$L(t) = A \exp[-B/(t+t_0)] + C$$

Une fois les résultats entièrement calculés, la
15 représentation de ceux-ci peut être visualisée sous toute forme appropriée à l'étape 500.

Par exemple, dans le cadre d'un procédé de description des répertoires du système immunitaire présenté dans la demande FR 91 00189, on peut illustrer
20 les résultats sous forme d'une matrice tridimensionnelle dont deux axes correspondent aux amorces V et J, tandis que le troisième axe correspond à la valeur de taille des segments d'ADN détectés.

Les différents échantillons analysés qui
25 correspondent à des lignes différentes d'une section J/Taille de la matrice correspondent à des amorces J respectives et différentes d'une ligne à l'autre. Or ces diverses amorces J présentent des rendements différents. Pour permettre de comparer les valeurs représentées d'une
30 ligne à l'autre, il faut donc normaliser les valeurs mesurées, en fonction de rendement des amorces J, avant d'opérer la visualisation.

De même, les amorces V possèdent des rendements différents. Par conséquent, pour permettre de comparer
35 directement les valeurs représentées dans les diverses

sections J/Taille on procède de préférence à une normalisation des valeurs mesurées d'une section à l'autre, sur la base de mesures quantitatives réalisées selon le procédé décrit dans la demande de brevet FR 91 14089 relative à la détermination de la quantité d'un fragment d'ADN d'intérêt, avant de procéder à la représentation.

La présente invention permet d'améliorer nettement la précision de mesure de taille des fragments d'ADN.

10 En effet, alors que la comparaison grossière des fragments d'ADN migrant par électrophorèse, avec des standards de taille connue codéposés, selon l'état de la technique, permet au mieux de connaître la longueur des fragments d'ADN avec une précision de l'ordre de 1 à 2%,
15 selon l'invention au contraire, la précision de la mesure est de l'ordre de 0,3%.

Bien entendu la présente invention n'est pas limitée au mode de réalisation particulier qui vient d'être décrit mais s'étend à toute variante conforme à son esprit. En particulier dans le cas de l'utilisation
20 simultanée de plusieurs fluorophores émettant à des longueurs d'ondes différentes, comme indiqué précédemment, il est préférable de compléter le procédé qui vient d'être décrit, par un processus initial d'élimination du recouvrement des couleurs. On sait en effet que dans le
25 cas de multiples fluorophores, le signal fluorescent détecté, donne une contribution importante dans le canal de la couleur ad hoc, mais également, dû à l'imperfection du filtre situé devant le capteur, des contributions, certes moins importantes, dans les trois autres canaux.
30 Afin d'éliminer ces signaux parasites, les données enregistrées peuvent subir une opération qui consiste à multiplier la matrice de p lignes (p représentant le nombre de fluorophores utilisés) et de n points (où n est

le nombre de mesures réalisées pendant l'électrophorèse)
par une matrice carrée (pxp) caractéristique de
l'appareil. Une fois cette transformation linéaire
réalisée, les contributions parasites au signal d'une
5 couleur sont éliminées presque totalement.

REVENDICATIONS

1. Procédé de détermination de la taille en nucléotides de fragments d'ADN séparés par électrophorèse sur gel caractérisé par le fait qu'il comprend les étapes qui consistent à :

- i) mesurer le temps de migration, sur une longueur constante prédéterminée, de chaque fragment d'ADN détecté, et
- ii) établir une corrélation entre la taille de chaque fragment d'ADN détecté et le temps de migration de celui-ci.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la corrélation entre la taille (L) de chaque fragment d'ADN détecté et le temps de migration de celui-ci est établie sur la base de la loi :

$$L(t) = A \exp[-B/(t+t_0)] + C$$

dans laquelle A, B, C sont des constantes, t représente le temps de migration et t_0 représente une constante de temps.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé par le fait que la corrélation entre la taille (L) de chaque fragment d'ADN détecté et le temps de migration de celui-ci est établi sur la base de la loi :

$$L(t) = A \exp[-B/t] + C$$

dans laquelle A, B, C sont des constantes et t représente le temps de migration.

4. Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3, dans lequel des standards de taille connue sont codéposés sur le gel, caractérisé par le fait que la valeur des coefficients A, B et C est recherchée, pour les standards de taille connue, lorsque les fonctions dérivées partielles en A, B et C de la fonction suivante sont nulles :

35

$$f(A,B,C) = \sum_{i=1}^n [L_i - (A \exp(-B/t_i) + C)]^2$$

5 dans laquelle L_i représente les longueurs connues des standards de taille déposés, t_i représente le temps de migration de chacun de ces standards connus.

10 5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé par le fait que les standards de taille connue sont saisis automatiquement par comparaison de la courbe de mesure détectée dans une fenêtre de mesure réglable, avec un seuil progressivement abaissé jusqu'à obtention des i pics recherchés.

15 6. Procédé selon la revendication 4, caractérisé par le fait que les standards de taille connue sont saisis manuellement.

7. Procédé selon l'une des revendications 4 à 6, caractérisé par le fait que les coefficients A , B et C sont déterminés sur la base des relations suivantes :

$$\begin{aligned} & \sum_{i=1}^n (L_i - L) \exp(-B/t_i) \times \\ & \frac{\sum_{i=1}^n (\exp(-B/t_i) - \exp(-B/t)) \exp(-B/t_i) 1/t_i}{\sum_{i=1}^n (L_i - L) \exp(-B/t_i) 1/t_i} = \\ & \frac{\sum_{i=1}^n (\exp(-B/t_i) - \exp(-B/t)) \exp(-B/t_i)}{\sum_{i=1}^n (L_i - L) \exp(-B/t_i)} \end{aligned}$$

$$A = \left[\sum_{i=1}^n (L_i - L) \exp(-B/t_i) \right] /$$

$$\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\exp(-B/t_i) - \exp(-B/t)) \exp(-B/t_i)$$

$$5 \quad C = 1/n \sum_{i=1}^n [L_i - A \exp(-B/t_i)]$$

avec la notation que $X(t)$ désigne la moyenne de la fonction X sur les valeurs t_i :

$$10 \quad X(t) = (1/n) \sum_{i=1}^n X(t_i)$$

8. Procédé selon l'une des revendications 4 à 7, caractérisé par le fait que les coefficients A , B et C sont ensuite reportés, pour chaque standard de taille considérée dans la relation :

$$L(t) = A \exp[-B/(t+t_0)] + C,$$

les valeurs de taille ainsi obtenues étant comparées aux valeurs de taille connue afin de reprendre le processus de calcul des coefficients A , B et C en vue d'une optimisation si l'erreur entre la taille mesurée et la taille connue des standards dépasse un seuil prédéterminé.

9. Procédé selon l'une des revendications 4 à 8, caractérisé par le fait qu'il comprend en outre l'étape consistant à déterminer les coefficients A , B et C pour chaque piste de mesure à l'aide d'une interpolation des positions t_i mesurées pour les standards de taille connue, suivie d'un calcul des coefficients A , B et C à partir des valeurs t_i résultant de l'interpolation.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé par le fait que l'interpolation est une interpolation linéaire.

11. Procédé selon la revendication 9, caractérisé par le fait que l'interpolation est de type parabolique.

12. Procédé selon la revendication 11,

caractérisé par le fait que l'interpolation est une interpolation de Simpson.

13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé par le fait que le gel support utilisé pour l'électrophorèse présente des séries de pistes de mesure présentant des origines temporelles respectivement décalées et que le procédé comprend les étapes consistant à calculer les coefficients A, B et C pour les standards de taille et à opérer ultérieurement une interpolation des positions t_1 obtenues à l'aide des standards de taille, suivie d'un calcul des coefficients A, B et C correspondants, sur les pistes de mesure, pour chaque origine temporelle de migration.

14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé par le fait que les courbes issues du capteur sont mémorisées, de préférence à raison d'un fichier par piste de mesure.

15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé par le fait que les courbes issues du capteur font l'objet d'un filtrage.

16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé par le fait que l'étape de filtrage comprend un filtrage passe-bas.

17. Procédé selon l'une des revendications 15 ou 16, caractérisé par le fait que l'étape de filtrage comprend un filtrage de Lanczos.

18. Procédé selon l'une des revendications 15 à 17, caractérisé par le fait qu'il comprend en outre l'étape de soustraction de la ligne de base de la courbe mesurée.

19. Procédé selon l'une des revendications 1 à 18, caractérisé par le fait qu'il est mis en oeuvre dans le cadre d'un procédé de description des répertoires du système immunitaire et qu'il comprend la visualisation du répertoire sous forme d'une matrice tridimensionnelle dont

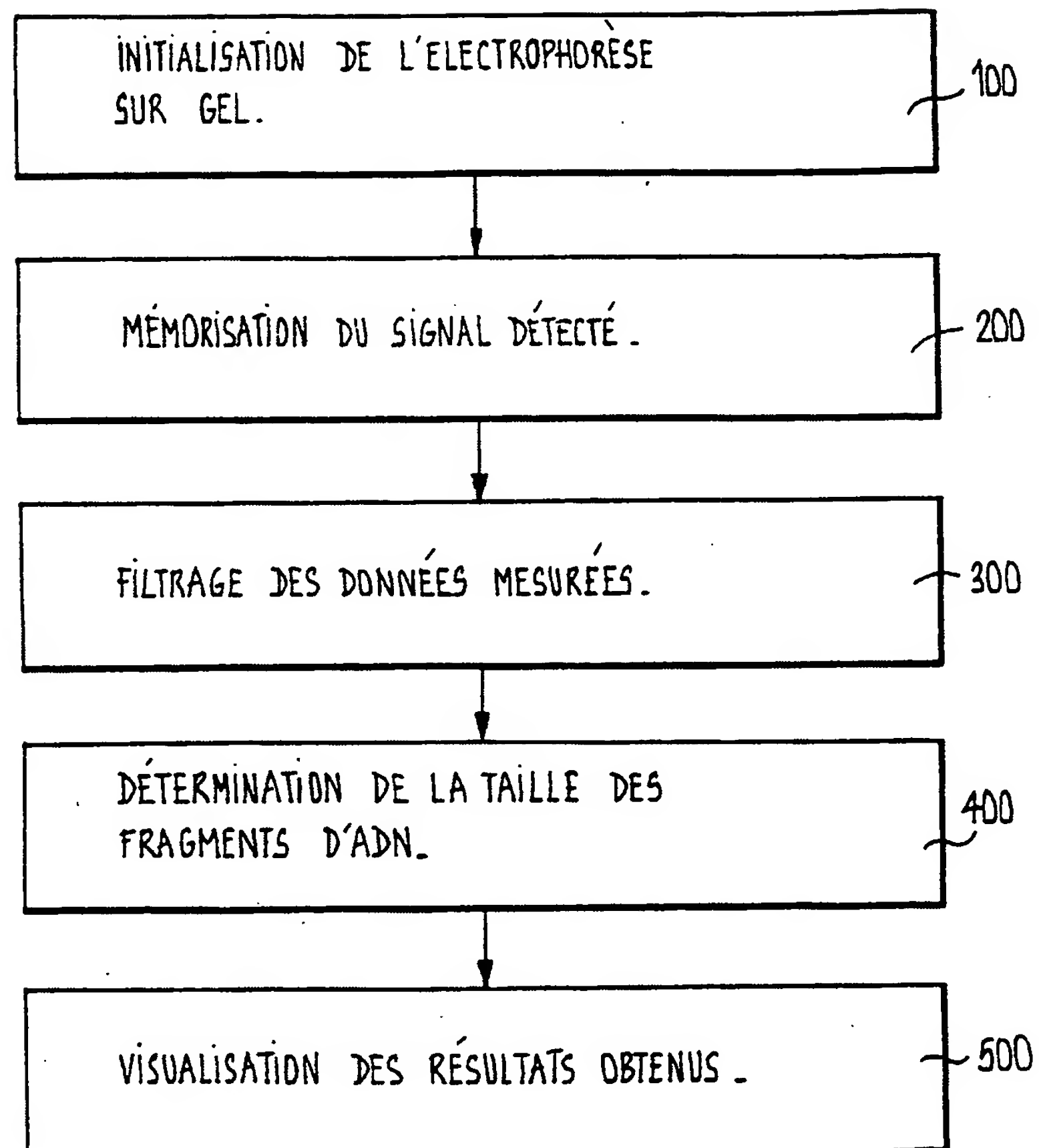
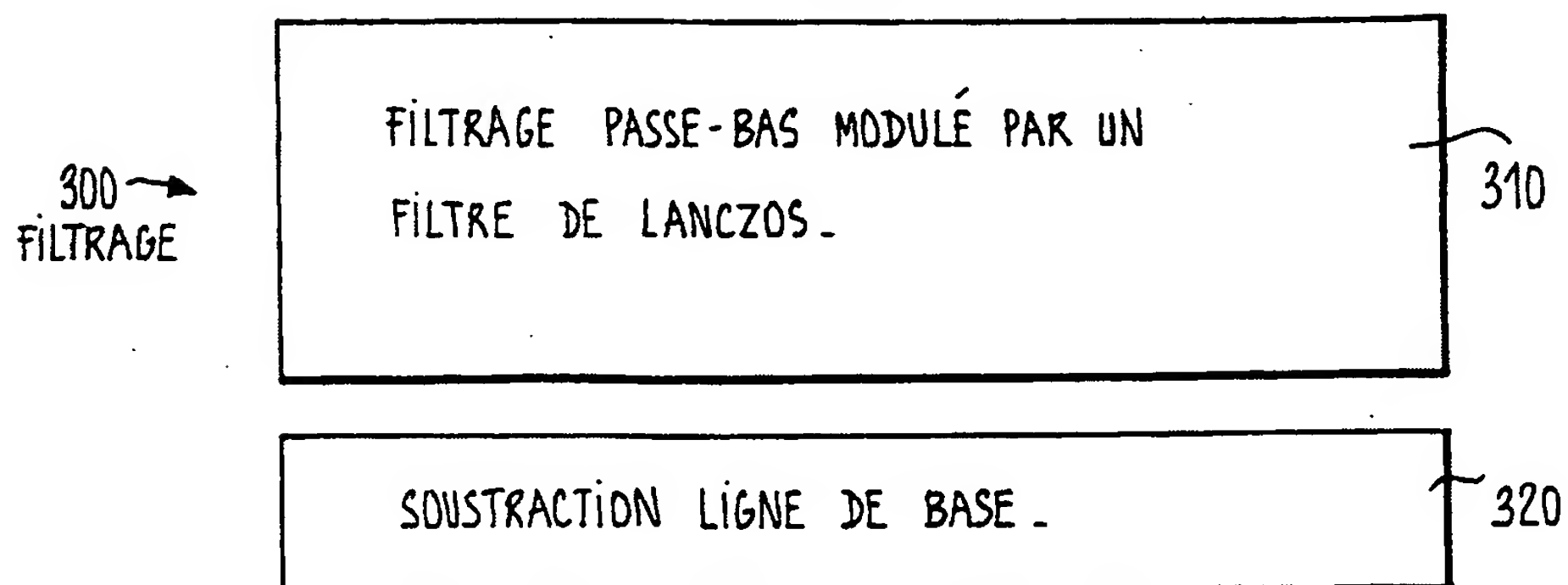
deux axes correspondent aux amorces V et J tandis que le troisième axe correspond à la valeur de taille des segments d'ADN détectés, et qu'il comprend en outre l'étape de normalisation des valeurs mesurées, en fonction du rendement des amorces J, avant d'opérer la visualisation sur chaque section J/Taille de la matrice.

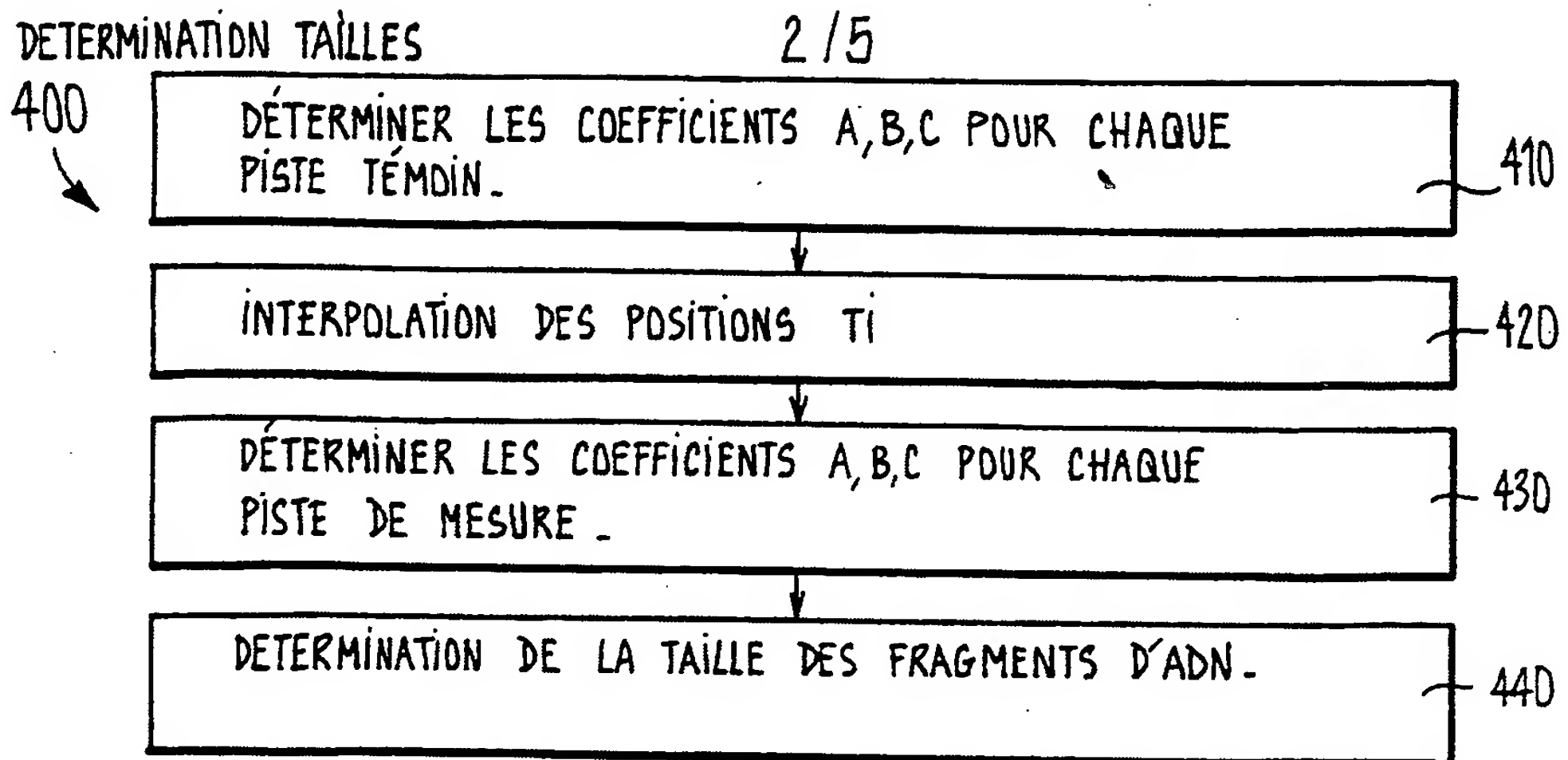
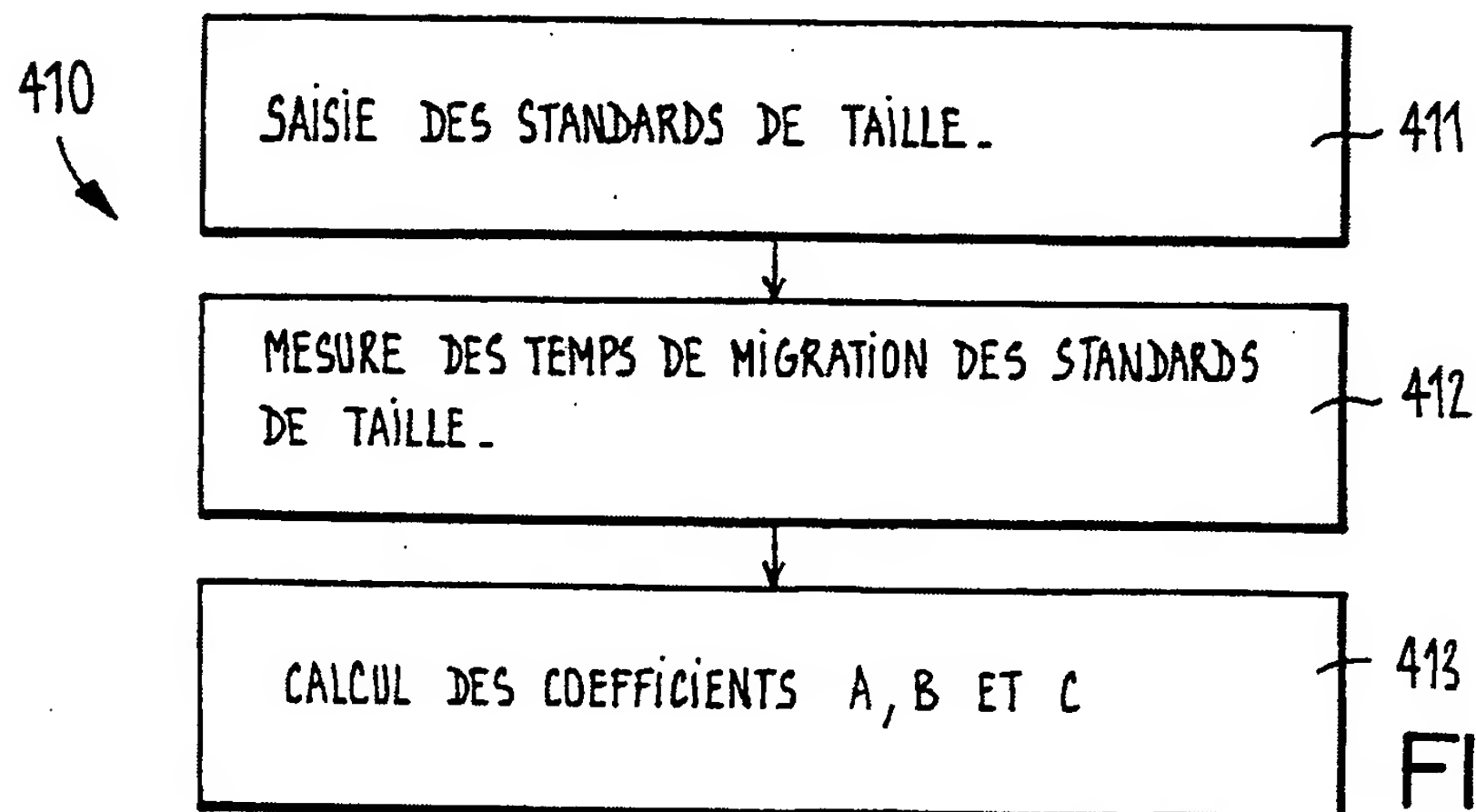
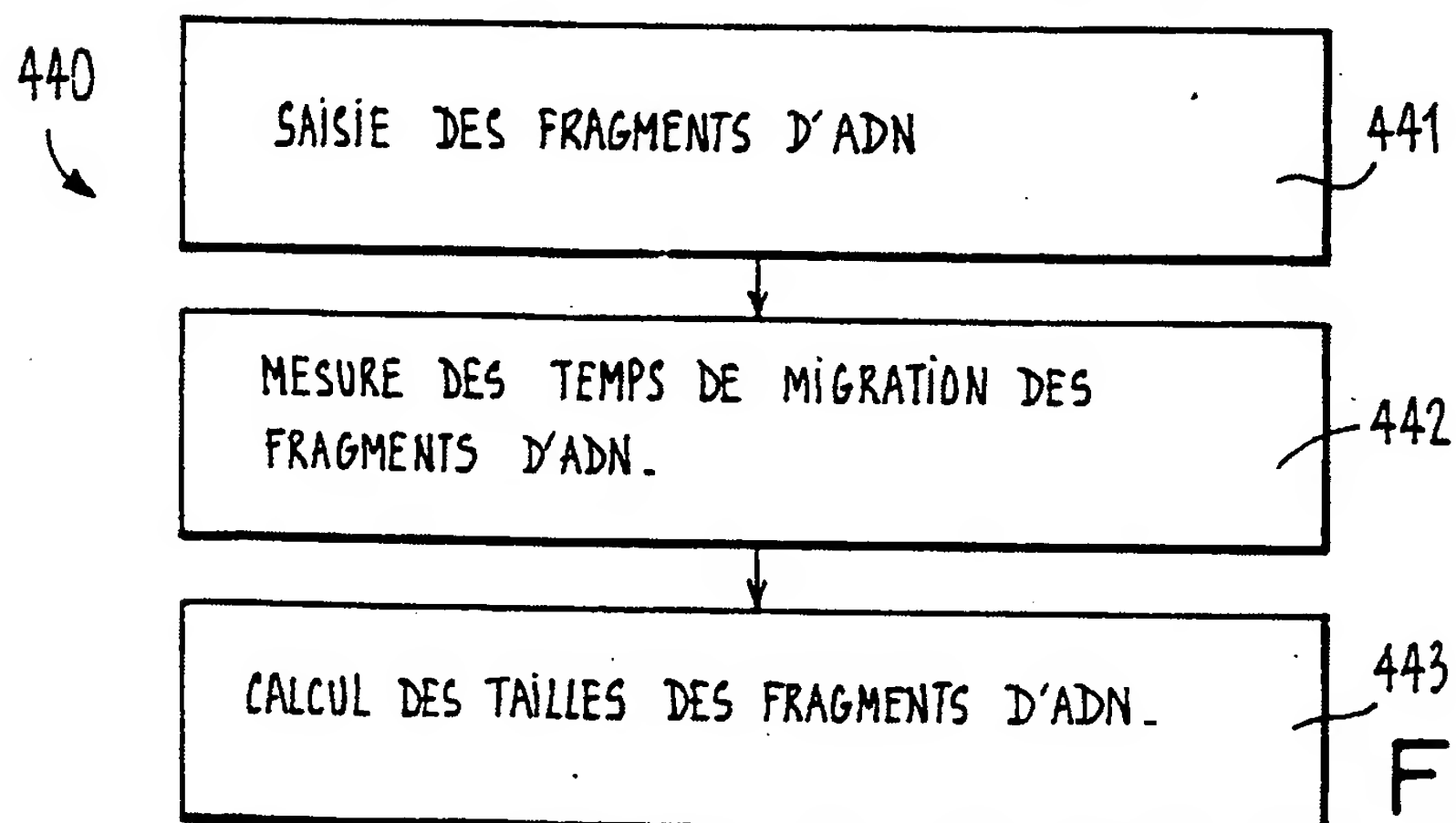
20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé par le fait qu'il comprend en outre l'étape de normalisation des valeurs mesurées, d'une section J/Taille à l'autre, avant de procéder à la représentation de la matrice.

21. Procédé selon l'une des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait que les pics du signal correspondant aux fragments d'ADN sont saisis manuellement.

22. Procédé selon l'une des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait que les pics du signal correspondant aux fragments d'ADN sont saisis automatiquement.

1/5

FIG.1FIG.2

FIG. 3FIG. 4FIG. 7

3/5

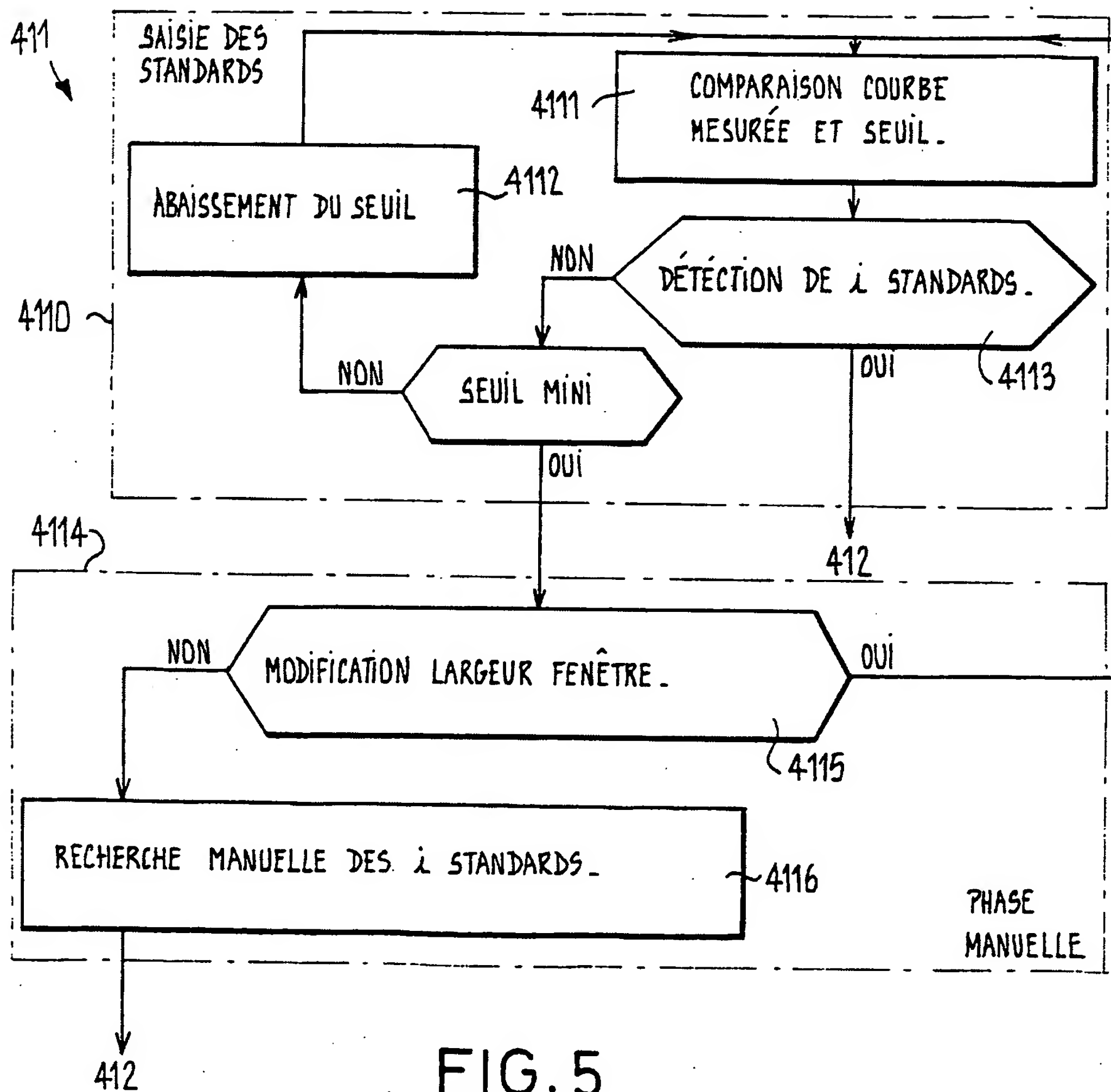


FIG. 5

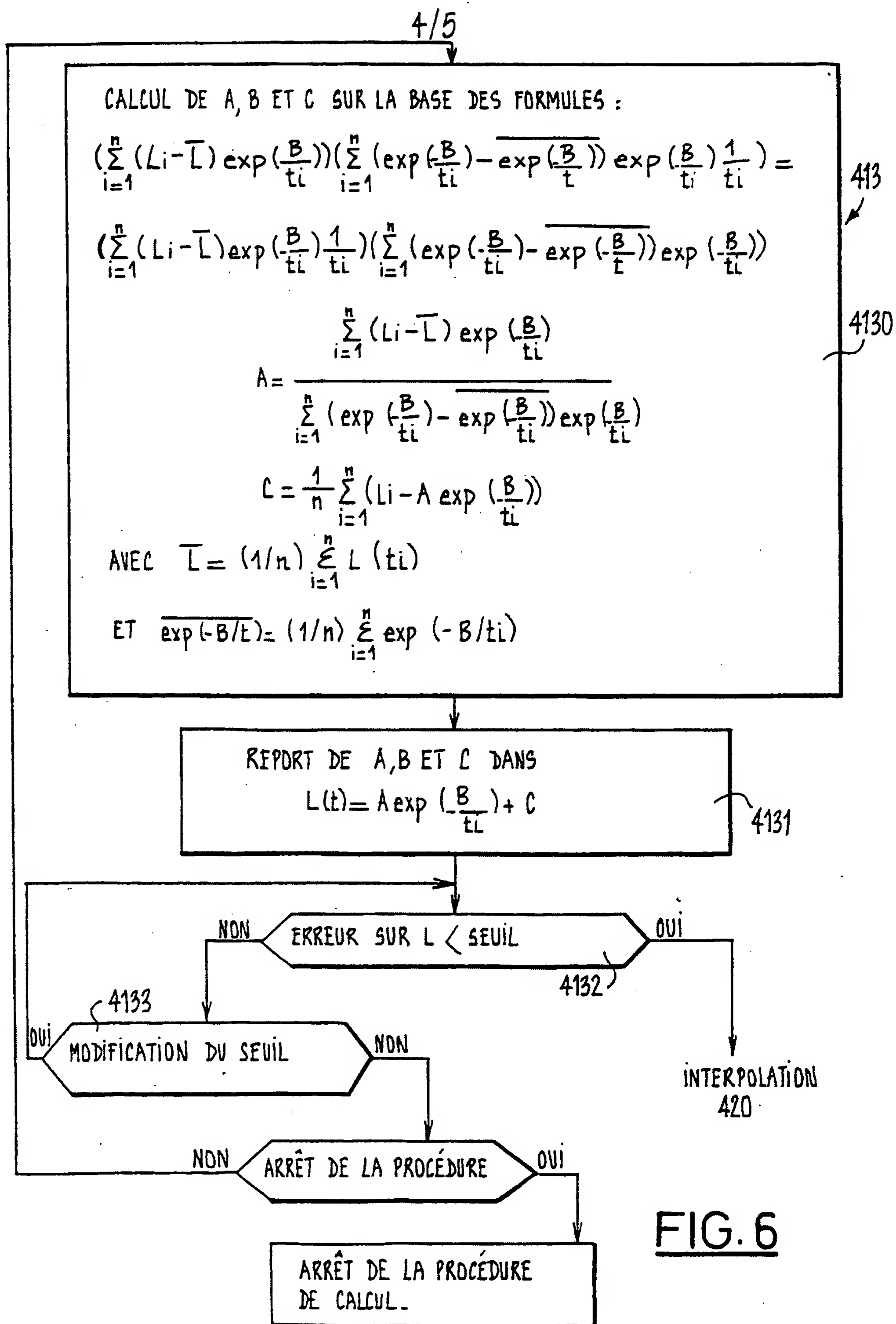


FIG. 6

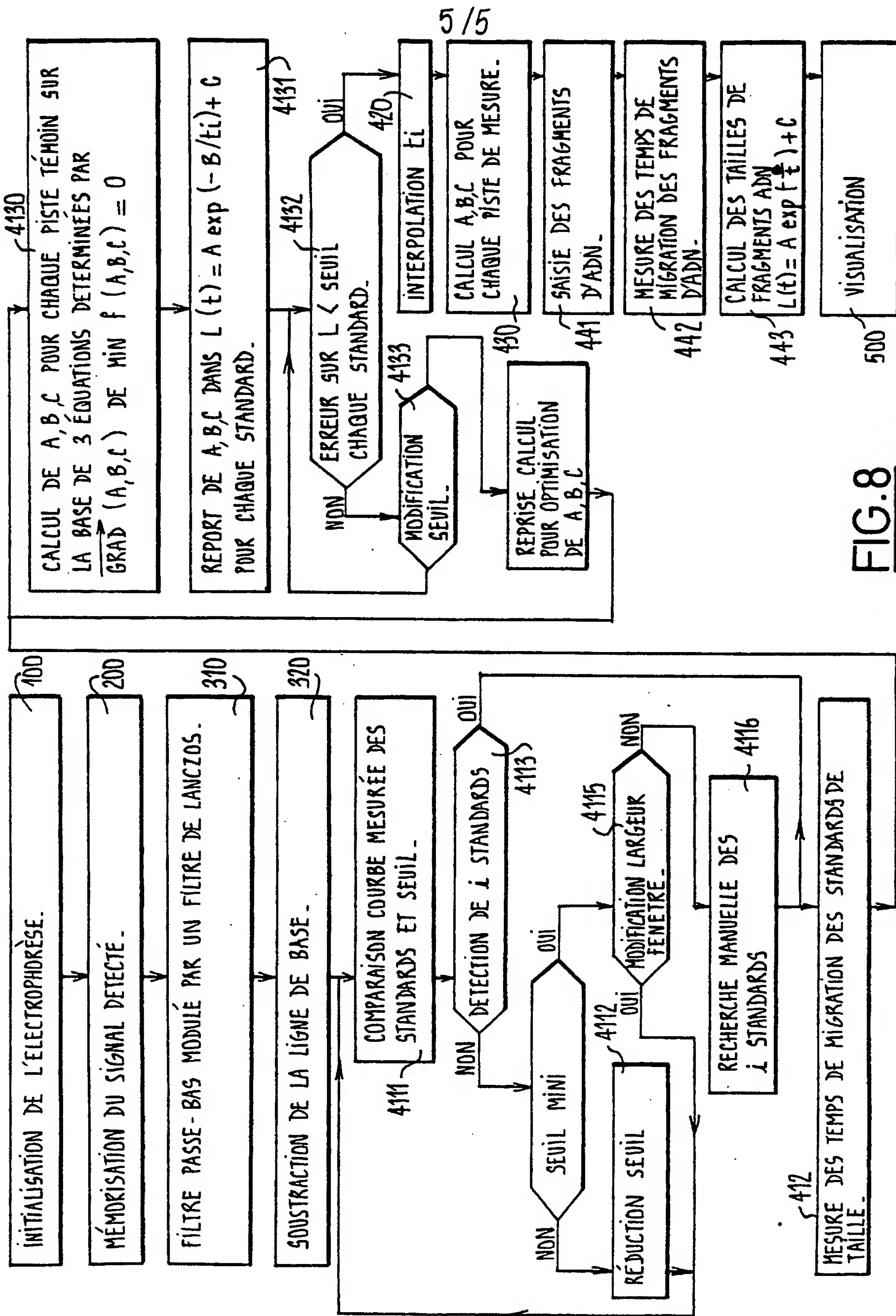


FIG.8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00675

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁵ C12Q1/68
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁵ C12Q; G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	T.MANIATIS ET AL. (EDS.) "Molecular cloning. A laboratory manual" 1989, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, NEW YORK US see page 6.4 see figure 6.1	1-3
A	A.L.LEHNINGER "Biochemistry" 1975, WORTH PUBLISHERS, INC., NEW YORK US see page 174 - page 176 see page 180	1-3
A	DATABASE WPIL, Week 9151, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 91-371721 & JP, A, 3243857 (HITACHI KK) 30 October 1991 see abstract	1
		./...



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 September 1993 (07.09.93)

Date of mailing of the international search report

01 October 1993 (01.10.93)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Patent provided by Sughrue Mion PLLC - <http://www.sughrue.com>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00675

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,9200796 (THE RESEARCH FOUNDATION OF THE STATE UNIVERSITY OF NEW YORK) 23 January 1992 *abstract*	1
A	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY Vol. 189, No. 2, 1 September 1990, NEW YORK US pages 235 - 243 K.E. OERTER ET AL: see the whole document	1-12
A	BIOCHEMISTRY Vol.22, No.26, 1983, EASTON US pages 6180-6185 N.C.STELLWAGEN see the whole document	1-12
A	US,A,4811218 (M.W.HUNKAPILLER ET AL.) 7 March 1989 cited in the application see column 2, line 55 - column 3, line 30	1,5,6, 21,22
A	WO,A,9004648 (A.A.MORLEY) 03 May 1990 see the whole document	1,19-22
P,X	WO,A,9212260 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 23 July 1992 see the whole document & FR,A,2671356 cited in the application	1,19-22

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9300675
SA 76831

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

07/09/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9200796	23-01-92	US-A- 5215883 AU-A- 8238991	01-06-93 04-02-92
US-A-4811218	07-03-89	None	
WO-A-9004648	03-05-90	None	
WO-A-9212260	23-07-92	FR-A- 2671356	10-07-92

EPO FORM P0479

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 93/00675

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB <div style="font-size: 1.2em; margin-top: 5px;">CIB 5 C12Q1/68</div>		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12Q ; G01N	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ^o	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
X	T.MANIATIS ET AL. (EDS.) 'Molecular cloning. A laboratory manual' 1989, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, NEW YORK US voir page 6.4 voir figure 6.1	1-3
A	<div style="text-align: center;">---</div> A.L.LEHNINGER 'Biochemistry' 1975, WORTH PUBLISHERS, INC., NEW YORK US voir page 174 - page 176 voir page 180 <div style="text-align: center;">---</div> <div style="text-align: right; margin-top: 10px;">-/--</div>	1-3
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>^o Catégories spéciales de documents cités:¹¹</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"A" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="font-size: 1.2em; margin-top: 5px;">07 SEPTEMBRE 1993</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="font-size: 1.2em; margin-top: 5px;">01.10.93</div>
Administration chargée de la recherche internationale <div style="font-size: 1.2em; margin-top: 5px; text-align: center;">OFFICE EUROPEEN DES BREVETS</div>		Signature du fonctionnaire autorisé <div style="font-size: 1.2em; margin-top: 5px; text-align: center;">DE KOK A.J</div>

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDiques SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie °	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
A	<p>DATABASE WPIL Week 9151, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 91-371721 & JP,A,3 243 857 (HITACHI KK) 30 Octobre 1991 voir abrégé</p> <p>---</p>	1
A	<p>WO,A,9 200 796 (THE RESEARCH FOUNDATION OF THE STATE UNIVERSITY OF NEW YORK) 23 Janvier 1992 * abstract *</p> <p>---</p>	1
A	<p>ANALYTICAL BIOCHEMISTRY vol. 189, no. 2, 1 Septembre 1990, NEW YORK US pages 235 - 243 K.E.OERTER ET AL. voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-12
A	<p>BIOCHEMISTRY vol. 22, no. 26, 1983, EASTON US pages 6180 - 6185 N.C.STELLWAGEN voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-12
A	<p>US,A,4 811 218 (M.W.HUNKAPILLER ET AL.) 7 Mars 1989 cité dans la demande voir colonne 2, ligne 55 - colonne 3, ligne 30</p> <p>---</p>	1,5,6, 21,22
A	<p>WO,A,9 004 648 (A.A.MORLEY) 3 Mai 1990 voir le document en entier</p> <p>---</p>	1,19-22
P,X	<p>WO,A,9 212 260 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 23 Juillet 1992 voir le document en entier & FR,A,2 671 356 cité dans la demande</p> <p>-----</p>	1,19-22

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9300675
SA 76831

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

07/09/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9200796	23-01-92	US-A- 5215883 AU-A- 8238991	01-06-93 04-02-92
US-A-4811218	07-03-89	Aucun	
WO-A-9004648	03-05-90	Aucun	
WO-A-9212260	23-07-92	FR-A- 2671356	10-07-92

EPO FORM P0072

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82